

NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj 07.03.2016. godine, broj 5940/3 imenovana je komisija za ocenu završne doktorske disertacije pod naslovom:

“Analiza polimorfizna u genima za receptore polnih steroida kod žena sa primarnom prevremenom insuficijencijom ovarijuma”

kandidata mr dr Maje Frani -Ivaniševi , zaposlene na Klinici za ginekologiju i akušerstvo Klini kog Centra Srbije. Mentor je Prof.dr. Svetlana Vujovi .

Komisija za ocenu završne doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof.dr. Svetlana Dragojevi -Diki , vanredni profesor, Klinika za ginekologiju i akušerstvo “Narodni front”, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu
2. Prof.dr. Ivana Novakovi , redovni profesor, Klinika za neurologiju KCS, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu
3. Prof.dr. Spasoje Petkovi , redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, “Nova plus” Specijalna bolnica za ginekologiju i akušerstvo, Beograd.

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završne doktorske disertacije jednoglasno podnosi Nau nom ve u Medicinskog fakulteta slede i

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija mr sci Maje Frani -Ivaniševi napisana je na 70 strana i podeljena je na sledeće poglavlja: uvod, ciljevi rada, material i metodi, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 16 grafikona, 18 tabela, 1 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćena imena korištenih u tekstu.

U **uvodu** je jasno data definicija primarne prevremene insuficijencije ovarijuma (PPOI), kao i incidence javljane bolesti. Prikazana su saznanja o etiopatogenezi PPOI, s posebnim osvrtom na genetičke uzroke bolesti koji su detaljno opisani. Detaljno su prikazana saznanja o: mutaciji gena za FSH receptor, aberaciji X hromozoma, mutaciji gena za transkripcijske faktore, progesteronskim androgenim i estrogenim receptorima kao i saznanja o faktorima razvoja folikulogeneze. Tako su prikazani geni kandidati i njihova funkcija u patogenezi PPOI. Pored toga definisana je klinička slika bolesti kao i njena dijagnoza i terapija kako sada tako i budući kada se tačno budu znali geni odgovorni za PPOI.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se u ispitivanju:

1. Da li polimorfizmi mikrosatelitnih ponovaka u genima za estrogenski receptor alfa - ESR1(TA)_n, estrogenski receptor beta - ESR2(CA)_n, androgenskih receptora - AR(CAG)_n, i AR(GGN)_n predstavljaju etiološki faktor u nastajanju PPOI-a kod srpskih žena
2. Da li su polimorfizmi gena za ESR1 povezani sa PPOI kod srpskih žena
3. Da li su varijante koje se nalaze u velikoj Han kineskoj kohorti-8q22.3 SNPs rs3847153 i rs 3108910 i po jedan SNP u HK3 (rs2278493), ESR1 (rs2234693) i BRSK 1 (rs12611091) povezane sa PPOI u srpskoj kohorti
4. I- da li varijante u SOHLH2 genu doprinose primarnoj prevremenoj insuficijenciji ovarijuma (PPOI) kod žena u različitim etničkim grupama
5. II- Ispitati karakteristike srpskih žena sa PPOI i različitim varijantama SOHLH2 gena
6. Ispitati odnos između u COLIA1 genskog polimorfizma i indeksa mineralne gustine kostiju (BMD) kod srpskih žena sa PPOI-om

U poglavlju **Matrerijski i metode** navedeno je da je studija izvođena na Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Klinički Centar Srbije između 2007. i 2010. godine. Sve žene uključene u ovu studiju potpisale su pismeni pristanak koji je odobren od strane lokalnog odbora za etiku u Beogradu. Genetska ispitivanja radjena su na University Hospital of Leicester, u Leicesteru u Engleskoj. Za svako ispitivanje su pojedinačno navedene procedure i tehnike kao i na in izvođenja.

U poglavlju **Rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pogledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

Korišćena **literatura** sadrži 139 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Ovo istraživanje pokazalo je sledeće rezultate:

- PPOI pacijenti su nosili kraće ponavljanje dužine ESR2(CA), nego ispitanice kontrolne grupe ($p = 0.034$) kod srpskih žena, ali je razlika bila mala. ESR1(TA) je bio na granici statističke razlike između grupa ($p = 0.059$). AR(CAG) i (GGN) nije imao nikakvu povezanost sa PPOI kod srpskih žena.

- Nisu nađene statistički značajne razlike u distribuciji ESR1 Pvu II i Xba I polimorfizma ili haplotipovima između PPOI i kontrolne grupe.

- Ni jedna SNP asocijacija koja je povezana sa PPOI i pronađena u kineskoj kohorti nije povezana kod srpskog uzorka žena.

- Jedanaest novih heterozigotnih varijanti je indentifikovano u našim grupama žena sa PPOI, ali su odsutni u kontrolnim, što je rezultiralo u uestalosti SOHLH2 varijante od 2.2% (8/364, kineskih) i 3.6% (7/197, srpskih), respektivno. Od toga, p.Glu79Lis (2 slučaja), p.Glu105Gli i p.Thr321Pro indentifikovano kod četiri kineske žene i p.Leu120Phe (3 slučaja) i p.Leu204Phe kod četiri srpske žene, nisu bili identični. Poravnanje proteina otkrilo je da su p.Glu79Lis i p.Glu105Gli uključili aminokiseline visoko otkrivene u sisarima, koji su bili pretpostavljeni da su štetni. C-210G>T varijanta nađena kod kineske PPOI kohorte leži u jezgru regiona promotera visoko koncentrisana sa pretpostavljenim faktorom transkripcije vezivanja i CpG ostrvima. Kod srpske kohorte, varijanta koja najverovatnije ima štetan uticaj je c.530+6T>G, za koju se pretpostavlja da utiče na spajanje RNK i rezultuje u besmislenom posredovanju propadanja (NMD) alternativnih transkripata. Ometanje izraza, transaktivaciona

aktivnost ili homo/hetero-dimerizacija SOHLH2 proteina može da dovede do disfunkcije jajnika.

- II- Dobijeni rezultati ukazuju da nema statistički značajne razlike između grupa u hormonskom statusu za FSH, LH, E₂, prolaktin i progesteron ($p > 0.05$), godinama starosti pri ulasku u menopauzu ($t = 1.963$; $p = 0.051$), kao ni između vrednosti BMI ($t = 1.565$; $p = 0.120$). Postoji statistički značajna slaba pozitivna povezanost godina starosti pri ulasku u menopauzu i vrednosti BMI kod grupe sa PPOI ($r = 0.284$; $p = 0.001$). Ne postoji statistički značajna povezanost godina starosti pri ulasku u menopauzu i vrednosti BMI kod grupe sa PPOI i nekom od varijanti SOHLH2 ($r = 0.012$; $p = 0.978$).

- Relativna distribucija COLIA 1 genotip alela je SS-54.4%, Ss-41.0% i ss-4.5%. Nije nađena statistički značajna razlika između grupa genotipova u indeksu telesne mase (BMI), starosti, trajanja amenoreje ili BMI. Značajna pozitivna korelacija je nađena između BMI i pariteta.

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

1. ispitivanje polimorfizma mikrosatelitnih ponovaka u genima za gonadne steroide kod srpskih žena sa PPOI-om. Rezultati ove studije pokazuju da polimorfizmi mikrosatelitnih ponovaka u genima za ESR1(TA)_n i ESR2(CA)_n mogu imati potencijalnu ulogu u genetskom mehanizmu etiologije PPOI-a. Nije nađena statistički značajna razlika u pojavi AR(CAG)_n i AR(GGN)_n kod srpskih žena sa PPOI-om.

Gennari i saradnici (2005.) su pokazali da se broj ESR1(TA)_n ponavaka razlikuje prema etničkoj pripadnosti, sa procenjenim glavnim pikovima na 14 ponavaka kod evropskih populacija i 15 ponavaka kod azijskih populacija. U ovoj studiji glavni pik ESR1(TA)_n je na 15 ponavaka za srpsku populaciju. Utvrđeno je da srpske pacijentkinje sa PPOI-om imaju nešto kraće dužine ponavaka od kontrolne, ali „p“ vrednost je bila na granici značajnosti. Ovo nije u skladu sa studijom sprovedenom kod korejske populacije kojom se sugerira da ESR1(TA)_n ne doprinosi razvoju PPOI-a (Yoon SH, Choi YM et al, 2010). Osim toga su našli da su kratki aleli u ESR1(TA)_n bili značajno ređi kod PPOI u poređenju sa azijskim ženama (Bretherick KL et al, 2008).

Analizirano je kodiranje regiona tandemskih ponavaka AR gena: 8-35CAG ponavaka (kodiranje poliglutaminom, poly Q) i 7-27 GGN ponavaka (kodiranje poliglicinom, poly G). Zajedno, ovi polimorfizmi javljaju se približno kod 90% žena koje imaju heterozigotne alele

gena za AR. Trakt poliglutamina i poliglicina ograničava aktivaciju funkcije-1 (AF1) domen AR proteina i oba su prijavljena da su modulatori faktora aktivnosti AR transkripcija (Nicolas Diaz-Chico B ET ALL, 2007). Tsezou i saradnici (2008) su našli da CAG poliglutamin pružanje, u amino-terminalnom domenu gena za AR, obrnuto utiče na funkciju receptora, kao faktora transkripcije, a pretpostavlja se da utiče u interakcijama između AR proteina i različitih koaktivatora, sa dugim ponavcima kao inhibitorima ovih interakcija, čime se objašnjava niža aktivnost receptora. Analiza naše studije sa kontinuiranim promenljivim je pokazala da varijante u genu za AR(CAG)_n i AR(GGN)_n nisu pokazale povezanost sa PPOI-om u našoj kohorti ispitanica. Između četiri ispitivana mikrosatelita u literaturi je AR(CAG)_n najčešće testiran kod PPOI-a (Chatterjee S et al, 2009; Sugawa F et al, 2009; Panda B et al, 2011). Različiti izveštaji u vezi dužine alela mogu se objasniti genetičkim razlikama u etničkim različitim populacijama, a možda i zbog različitih veličina uzoraka. Na osnovu rezultata ove studije, možemo sa oprezom izvesti i kontraverzan zaključak da varijante u genu za AR(CAG)_n i (GGN)_n nemaju ključnu ulogu u disfunkciji folikula kod PPOI-a.

2. ispitivanja povezanosti polimorfizama gena za ESR1 sa PPOI kod srpskih žena

U ovoj studiji nije nađena bilo kakva povezanost ESR1 PvuII i Xba I sa intronim SNP polimorfizmom kod PPOI pacijentkinja srpskog porekla. Evidentno je da je T alel Pvu II SNP češći i kod PPOI kohorte pacijenata nego u kontrolnoj grupi, što formalno ne isključuje činjenicu da T alel ima uticaj na PPOI. Povećanje veličine kohorte pacijenata i kontrola garantuje obezbeđivanje dovoljne statističke moći da bi se otkrile razlike dve grupe, iako je naša studija najviše objavljena do sada.

Cordts i saradnici (2012) ispitivali su 70 PPOI pacijentkinja i 73 zdrave žena u menopauzi, brazilskog porekla. Našli su povezanost PVU II polimorfizma sa PPOI ali ne i povezanost Xba I polimorfizma sa PPOI. Bretherick i saradnici (2012) ispitivali su 55 PPOI pacijentkinja i 107 kontrolnih, bile su belkinje azijskog porekla. Našao je manju frekvencu TT genotipa u Pvu II i AA genotipa u Xba I kod PPOI u odnosu na kontrole ($p = 0.0001$). Liu i saradnici (2013) ispitivali su 155 idiopatskih PPOI pacijentkinja i 150 zdravih kontrola, kineskog porekla. Frekvencija P alela Pvu II je značajno veća kod pacijentkinja sa PPOI nego u kontrolnoj grupi ($p = 0.008$) i frekvencija X(G) alela Xba I je takođe bila veća kod pacijentkinja sa PPOI ($p = 0.013$). Nosioци CC(PP) genotipa su imali veći rizik od PPOI nego oni sa TT(pp) genotipovima ($p = 0.011$). Haplotip CG(PX) bio je povezan sa značajno povećanim rizikom od Idiopatske PPOI. Yoon i saradnici (2010) ispitivali su 125 PPOI pacijentkinja i 221 kontrolnih

žena koje su bile u menopauzi. Sve ispitanice su bile Korejskog porekla. Studija je pokazala da nema povezanosti između Xba I i PPOI. Načena je viša frekvencija TT genotipa (PvuII) kod PPOI u odnosu na kontrole ($p = 0.004$) i frekvencija TA haplotipa značajno veća kod PPOI pacijenata u odnosu na kontrole ($p = 0.002$). Nedostatak povezanosti u našoj studiji nije u korelaciji sa nalazima predhodne studije (105). Razlika nije zbog veličine uzorka koji je nešto manji u predhodnoj studiji sa korejskim ženama u odnosu na našu, ali ukazuje na to da njihovi rezultati mogu biti specifični za korejsku populaciju. Yang i saradnici (2010) su ispitali 100 PPOI pacijentkinja i 200 zdravih žena u menopauzi korejskog porekla. Nije pronađeno da je značajni efekat alela povezan sa Pvu II genotipom, ali je pronađeno da je X(G) alel Xba I varijante povezan sa smanjenim rizikom od PPOI. CA(Px) haplotip je značajno smanjio rizik za idiopatsku PPOI.

3. ispitivanja povezanosti varijanti koje se nalaze u velikoj Han kineskoj kohorti - 8q22.3 SNPs rs3847153 i rs 3108910 i po jedan SNP u HK3 (rs2278493), ESR1 (rs2234693) i BRSK 1 (rs12611091) sa PPOI u srpskoj kohorti

U velikom Han kineskom uzorku, značaj za SNP je postojao za 8q22.3 ($p = 10^{-6}$) ili HK3, ESR1, BRSK1 ($p = 0.05$). Rezultati ove studije mogu ukazivati na to da različiti narodi mogu pokazivati razlike u putevima genske regulacije i gena koji uzrokuju PPOI. Slične razlike su zabeležene u FSHR, BMP15, NOBOX, FOXL2, TGFBR3, CDKN1B, FOXO3A (Tiotiu D et al, 2010; Qin Y, Choi Y et al, 2007; Dixit H et al, 2006; Zhao XX et al, 2005; Qin Y, Shi Y et al, 2009). Iz toga je zaključeno da se uzrok PPOI ne bi trebao tražiti na osnovu rezultata iz jedne etničke grupe.

4. ispitivanja novih varijanti u SOHLH2 genima kod kineskih i srpskih žena sa PPOI

Ovom studijom je prvi put pokazano da je SOHLH2 gen odgovoran u etiologiji PPOI. Identifikovano je pet novih heterozigotnih nesinonimnih varijanti kod četiri kineske žene: p.Glu79Lis (2 slučaja), p.Glu105Gln i p.Thr321Pro, i kod četiri srpske žene: p.Leu120Phe (3 slučaja) i p.Leu204Phe

Studija je orijentisana na ispitivanje specifičnih gena uključenih u ranu ovogenezu i folikulogenezu. Moguće varijante FIGLA (Zhao H et al, 2008), NOBOX (Qin Y et al, 2007), LHX8 (Qin Y et al, 2008) su bile identifikovane u grupama pacijenata različitog etničkog porekla, što ukazuje da podskup žena sa PPOI širom sveta možda krije štetne varijante ovih gena. Specifično molekularno narušavanje u datom genu može da varira, čak i unutar etničke grupe (molekularna heterogenost). U ovoj studiji, ni jedna od pronađenih varijanti ne

objašnjava više od 10% slučajeva u bilo kojoj etničkoj grupi. Iz toga se može zaključiti da PPOI karakteriše genetska heterogenost u različitim etničkim grupama.

Studije asocijacije gena kandidata, analize niz-komparativne genomske hibridizacije (niz-CGH) i široke genske studije asocijacije (GWAS) esto su ograničene sa malom veličinom uzorka, čime se ograničava statistička moć da se otkrije pouzdana veza. GWAS najviše razmere našao je osetljiv lokus na 8q22.3 koji se nalazio u regionu koji je siromašan sa genima i u kome se ne nalaze geni kandidati (Qin Y et al, 2012). Veza ovog regiona i PPOI ostaje prihvatljiva, daju i posebnu pažnju pojačavajući uverenje da regulatorni geni mogu da postoje (Qin Y et al, 2012).

U ovoj studiji identifikacija novih heterozigotnih varijanti u SOHLH2 genu, kod žena sa PPOI kineskog i srpskog porekla, sugerise doprinos etiologiji PPOI. To ukazuje na ključnu ulogu faktora transkripcije SOHLH2 u ranoj ovogenezi i folikulogenezi.

5. ispitivanja za kolagen Tipa I Alfa1 genskog polimorfizma kod srpskih žena sa PPOI-om

Meta analiza podataka iz šesnaest objavljenih studija, uključujući i ukupno 4965 ispitanica, pokazala je značajnu vezu između prenosa u COLIA1 "s" alelu i niskom BMD (Mann V et al, 2001).

Rezultati ove studije su u saglasnosti sa rezultatima Liden i saradnika (Liden M et al, 1998) koji nije pronašao značajne razlike između genotipova grupa u vezi sa BMD lumbalnog dela kičme. Njegovo istraživanje je verovatno na malom broju ispitanica sa „ss“ homozigotnim genotipom, obzirom da je procenjena učestalost PPOI kod 0.9%-3% stanovništva (Coulam CB et al, 1986).

Neki istraživači su našli da COLIA1 aleli mogu da predvide prelome, nakon korelacije sa BMD, drugi istraživači nisu pronašli vezu između COLIA1 genotipa i BMD ili preloma usled osteoporoze (Heegaard A et al, 2000; Liden M et al, 1998). Postoje mnoge gen-gen i gen-okolina interakcije koje utiču na kvalitet kosti. Mnoge kosti su već pod uticajem velikog broja gena sa relativno malim efektima na kost, nego par gena sa velikim efektom, kao što su Kobayashi i saradnici primetili (Kobayashi N et al, 2002). Rezultati ove studije su konzistentni sa prethodnim nalazima (Kuschner PJ et al, 2000) da različiti geni mogu da deluju u različitim kombinacijama, i tako utiču na individualni stepen osetljivosti kod određenih ljudi. Kod mladih žena sa PPOI COLIA1 ne može identifikovati one koje su u većoj opasnosti od osteoporoze.

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. Franić -Ivanišević M, Franić D, Ivović M, Tanjić -Gajić M, Marina LJ, Bara M, Vujović S. Genetic etiology of premature ovarian insufficiency – modern approach. Acta Clinica Croatica, Jun 2016.

E) Zaključak

Doktorica disertacija „**Analiza polimorfizma u genima za receptore polnih steroida kod žena sa primarnom prevremenom insuficijencijom ovarijuma**“ dr Maje Franić -Ivanišević predstavlja originalni naučni doprinos u razotkrivanju genetskih uzroka PPOI, samim tim i njene patogeneze. Navedeni rezultati su pokazali da :

PPOI se smatra multifaktorijalnom bolešću, gde je fenotip najverovatnije posledica varijacije sekvence u više od jednog gena.

- Pacijenti sa PPOI nose krake ponovke u ESR1(TA)_n i ESR2(CA)_n i S aleli u ovim genima mogu se smatrati kao faktori rizika za PPOI kod srpskih žena.
- Dva ESR1 SNP, Pvu II i Xba, nisu uobičajno povezani sa PPOI kod srpskih žena i ne mogu da doprinesu genetskoj osnovi PPOI.
- Etički različiti narodi mogu da pokazuju razlike u putevima genske regulacije i gena koji uzrokuju PPOI.
- Naša identifikacija novih varijanti SOHLH2 gena kod kineskih i srpskih žena sa PPOI, snažno ukazuje na važnu ulogu SOHLH2 gena u etiologiji PPOI.
- Nove nesinonimne heterozigotne varijante SOHLH2 gena specifične za kineske žene sa PPOI su: p.Glu79Lys (štetna), p.105Gly (štetna), p.Thr321Pro.
- Nove nesinonimne heterozigotne varijante SOHLH2 gena specifične za srpske žene sa PPOI su: p.Leu120Phe, p.Leu204Phe.
- Kod mladih žena sa PPOI COLIA1 gen ne može identifikovati one koji su u većoj opasnosti od osteoporoze.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom vešću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Maje Franić-Ivanišević i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 24.06.2016.

Članovi komisije:

Prof. dr Svetlana Dragojević -Diki

Prof. dr Ivana Novaković

Prof. dr Spasoje Petković

Mentor:

Prof. dr Svetlana Vučković
